

Über das Verhalten
der Asparaginsäure und des Asparagins
im menschlichen Organismus -- eine optisch-
enzymatische Methode
zur Bestimmung von Asparagin

Johannes Kapuste

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel

ÜBER DAS VERHALTEN DER ASPARAGINSÄURE UND DES ASPARAGINS
IM MENSCHLICHEN ORGANISMUS - EINE OPTISCH-ENZYMATISCHE
METHODE ZUR BESTIMMUNG VON ASPARAGIN



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

von
Johannes Kapuste
aus
Wahlstatt

1959

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof. Dr. Wieland
Coreferent: Prof. Dr. Bodechtel
Dekan: Prof. Dr. Kollé

Tag der mündlichen Prüfung: 18. 12. 1958

Inhaltsverzeichnis

	Seite:
Einleitung	1
Bisherige Untersuchungen	2
Problemstellung	3
Methodik und Material	4
Prinzip der optisch-enzymatischen Bestimmung der	
Asparaginsäure nach Pfeleiderer	4
Prinzip der Asparagin-Bestimmung	5
Reagenzien	5
Eigene Untersuchungen	8
I. Ausarbeitung des Asparaginsäuretestes für	
Messungen in Harn und im Plasma	8
Test der Glutamat-Aspartat-Transaminase	8
Anreicherung der Transaminase	9
Vorversuche mit Standard-Lösungen	12
Messungen im Harn	13
Durchführung der Bestimmung der Asparaginsäure	17
II. Ausarbeitung einer optisch-enzymatischen Me-	
thode zur Bestimmung des Asparagins	18
Entwicklung einer optisch-enzymatischen Me-	
thode für Asparaginase-Aktivitätsbestimmungen	19
Versuche zur Bestimmung des Asparagins	21
Durchführung der Bestimmung des Asparagins	25
III. Nachweis von Aspartat und Asparagin im	
Papierchromatogramm mit Hilfe der Fluoreszenz	
im UV-Licht	25
IV. Anwendung der Methoden auf orientierende Mes-	
sungen bei Erkrankungen und bei Stoffwechselversuchen	26
Diskussion	28
Zusammenfassung	34
Literaturverzeichnis	35
Lebenslauf	37



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ÜBER DAS VERHALTEN DER ASPARAGINSÄURE UND DES ASPARAGINS IM MENSCHLICHEN ORGANISMUS. EINE OPTISCH-ENZYMATISCHE METHODE ZUR BESTIMMUNG VON ASPARAGIN

Einleitung

Im Zusammenhang mit den sich mehrenden Arbeiten über Aminoacidurie bei verschiedenen Stoffwechselerkrankungen (Übersichts-Referat: Berger (1)) gewinnt eine Untersuchung des Stoffwechsels einzelner Aminosäuren, gegenüber der viel häufiger verwendeten Bestimmung des Gesamt- α -amino-Stickstoffs, mehr und mehr an Bedeutung. Die Asparaginsäure nimmt unter den Aminosäuren eine besondere Stellung ein. Ihren Namen verdankt sie der Entdeckung und der hohen Konzentration ihres Monoamids, des Asparagins, im Spargel (Asparagus, von *σπαραγγειον*, ich sprosse). In sprossenden Pflanzen ist die Verbreitung des Asparagins allgemein auffallend, und seine Rolle als Amoniakdonator bei der Synthese anderer Aminosäuren in den Pflanzen erweckte das berechtigte Interesse der Physiologen. Der naheliegende Gedanke, das Asparagin nun auch für die pharmakologische Wirkung des Spargels verantwortlich zu machen, erwies sich jedoch als sehr gefährlich. Sowohl die diuretische Wirkung wie auch der eigentümliche Geruch des Harnes nach Spargelgenuß wurden immer wieder dem Asparagin zugeschrieben, und man kann noch heute im Pharmakologischen Wörterbuch (26) Asparagin als Diuretikum angegeben finden. Eine eigene Arbeit: "De l'odeur communiquée à l'urine par l'ingestion des pointes d'asperges" (27), und die Erklärung der diuretischen Wirkung des Spargels durch ihren Gehalt an Saponinen und auch an Kaliumsalzen mußte diesen Irrtum erst widerlegen (28). Im Stoffwechsel des tierischen Organismus dagegen zeigt sich die besondere Stellung der Asparaginsäure an ihrer Beteiligung an Transaminierungen und besonders an ihrer Verknüpfung mit der Harnstoff-Synthese nach dem von Krebs aufgestellten Ornithin-Zyklus. (Meister (2)). Deshalb erschien es von Interesse, das Verhalten der Asparaginsäure im Blut unter normalen Bedingungen und nach Belastung, sowie deren Ausscheidung im Harn etwas eingehender zu untersuchen. Zur Durchführung dieser Versuche bot sich die optisch-enzymatische Methode der Asparaginsäurebestimmung nach Pfeleiderer u. a. (3) infolge ihrer raschen und einfachen Handhabung als besonders geeignet an. Ein Überblick über die verschiedenen anderen Verfahren der Asparaginsäurebestimmung in biologischen Flüssigkeiten mag die Wahl dieser enzymatischen Methode begründen.

Bisherige Untersuchungen

Im allgemeinen werden bei Untersuchungen über Aminoacidurie chromatographische Bestimmungsverfahren angewendet. Qualitative und auch semiquantitative Bestimmungen werden dabei meist papierchromatographisch durchgeführt, während mit der Säulenchromatographie nach Stein und Moore (4) sehr gute quantitative Bestimmungen möglich sind. Diese Methode ist aber für die Untersuchung einer einzelnen Aminosäure zu umständlich. Insbesondere ist dieses Verfahren für Bestimmungen der Asparaginsäure im Harn und im Plasma ungeeignet, weil die Konzentrationen der freien Asparaginsäure in diesen Körperflüssigkeiten so klein sind, (Hier (5)) daß sie mit der Säulenchromatographie quantitativ nicht mehr sicher erfaßt werden können (Stein und Moore (6, 7)). Exakte Messungen dieser geringen Konzentrationen wurden bisher mit einer mikrobiologischen Methode durchgeführt (Hier (5)). Das Verfahren ist aber sehr zeitraubend und mit relativ großem experimentellem Aufwand verbunden, so daß seine Anwendung für klinische Routineuntersuchungen praktisch ausscheidet. Eine enzymatisch-manometrische Methode zur Bestimmung der Asparaginsäure und des Asparagins findet sich in einer Arbeit von Krebs (7). Ein in dieser Arbeit durchgeführter Vergleich mit einer Zusammenstellung weiterer Bestimmungsverfahren der Asparaginsäure fällt sehr zugunsten der entwickelten enzymatisch-manometrischen Bestimmungsweise aus. Aber auch dieser Test hat, ebenso wie das oben erwähnte enzymatische Verfahren nach Pfeleiderer u. a. den Nachteil einer für unsere Zwecke sehr geringen Empfindlichkeit. Die untere Grenze liegt nach Krebs bei etwa 15 gamma Aspartat pro ml, und nach Pfeleiderer bei etwa 10 μ /ml (wenn man von vorneherein mit der Möglichkeit rechnet, das Zehnfache des von Pfeleiderer angegebenen Volumens einzusetzen), während sich nach Hier (5) in einem ml Harn nur etwa 1,3 μ Asparaginsäure finden und die Konzentration im Serum ebenfalls nur in der gleichen Größenordnung zu erwarten wäre.

Die Konzentrationen der Asparaginsäure im hydrolysierten Harn betragen dagegen das Hundertfache (Hier (5)) und liegen auch im Serum nach Hydrolyse wesentlich höher. Zum größten Teil kommt also die Asparaginsäure in gebundener Form vor. Es handelt sich dabei um Asparagin, um ein Glukuronsäure-Konjugat (Pollack (8)) und um eine Reihe von Di- und Polypeptiden. Das sehr unbeständige Aspartylphosphat und (nach Stein und Moore (9)) Azetyl-Aspartat, welches in hohen Konzentrationen im Gehirn gefunden wurde (9), liegen wahrscheinlich nicht vor. Quantitative Bestimmungen dieser einzelnen Fraktionen der gebundenen Asparaginsäure wurden nur bezüglich des Asparagins gemacht (Stein und Moore (10)). Die Konzentrationen des Asparagins im

Harn und im Serum liegen höher als die eben genannten sehr geringen Konzentrationen der freien Asparaginsäure. In den Zellen und Organen dagegen ist die Konzentration der freien Säure wesentlich höher. Da außerdem bekannt ist, daß es bei Infusion von Aminosäure-Gemischen häufig zu Übelkeit und Erbrechen kommt, wenn die beiden Dicarbonsäuren Asparagin- und Glutaminsäure im Gemisch enthalten sind, äußerten Stein und Moore (6) die Vermutung, das Asparagin sei die Transportform der Asparaginsäure im Organismus. Für unsere Fragestellung erschien es deshalb notwendig, neben dem Aspartat auch das Asparagin auf einfache Weise bestimmen zu können.

Krebs hat in der oben genannten Arbeit eine Asparaginbestimmung durch Zusatz einer Asparaginase aus Meerschweinchen (Serum, Leber) zu dem für die Bestimmung der Asparaginsäure benutzten Testansatz angegeben, also durch Gewinnung der Asparaginsäure aus dem Asparagin durch einen enzymatischen Desamidierungsvorgang (siehe Gleichung 4). Die gleiche Möglichkeit ist aber auch für die optisch-enzymatische Bestimmung nach Pfeleiderer gegeben. Sie hat gegenüber der manometrischen den Vorteil eines für die Fermentwirkung günstiger liegenden pH, sowie alle Vorteile eines optischen Testes. Außerdem bietet sie die Möglichkeit, den Meßbereich empfindlicher zu gestalten. Aus all diesen Gründen erschien es sinnvoll, der optisch-enzymatischen Testmethode (Pfeleiderer) für unsere Untersuchungen den Vorrang zu geben.

Problemstellung

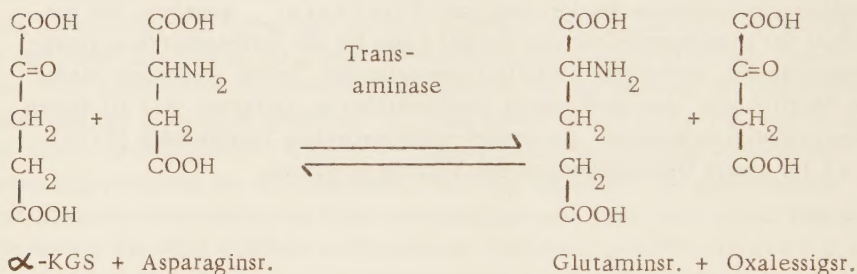
Das Ziel der Untersuchungen ist die Bestimmung von Asparaginsäure und Asparagin im Blut, das Verhalten nach Belastung, die Untersuchung der Ausscheidungsverhältnisse sowie der Natur der "Fraktion des gebundenen Aspartats".

Methodik und Material

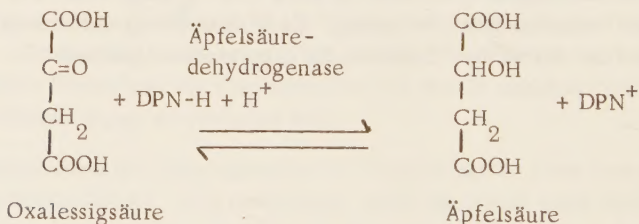
Prinzip der optisch-enzymatischen Bestimmung (nach Pfeleiderer):

Durch das Enzym Glutamat-Aspartat-Transaminase¹⁾ entsteht bei Gegenwart von α -Ketoglutarisäure und Asparaginsäure durch Transaminierung Glutaminsäure und Oxalessigsäure (Braunstein und Kritzman). Obwohl das Gleichgewicht dieser Reaktion (Gleichung 1) ganz auf Seiten der Asparaginsäure liegt, kann es durch die im Testansatz vorgesehene Hilfsreaktion (Gl. 2), die DPNH-abhängige Hydrierung von Oxalacetat zu Äpfelsäure durch das Enzym Äpfelsäuredehydrogenase, verschoben werden, so daß die Asparaginsäure schließlich quantitativ abreagiert und über Oxalacetat in Äpfelsäure umgewandelt wird.

Gleichung 1



Gleichung 2



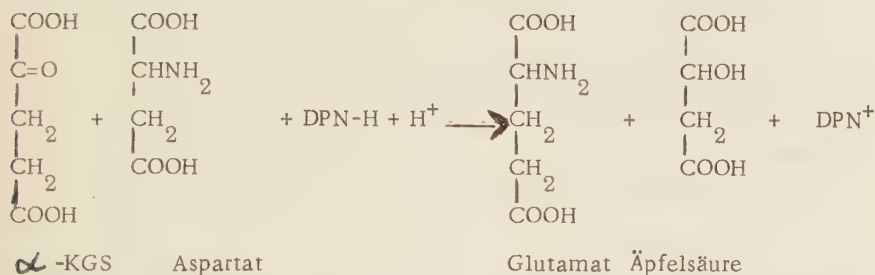
Das Co-Ferment der Reaktion, das hydrierte Diphospho-pyridin-nucleotid (DPN-H), wird dabei oxydiert, was mit dem Verschwinden der charakteristischen Lichtabsorption bei 340 - 366 m μ einhergeht und somit auf einfache Weise ver-

1) Die Änderung der Bezeichnung "Glutamat-Oxalacetat-Transaminase" in Glutamat-Aspartat-Transaminase" wird von Meister (2) vorgeschlagen, weil in der letzteren Bezeichnung zum Ausdruck kommt, daß die Reaktion von beiden Aminosäuren ihren Ausgang nehmen kann.

folgt werden kann (O. Warburg). Die Menge des verbrauchten Co-Fermentes DPN-H ist der ursprünglich vorhandenen Asparaginsäure äquivalent:

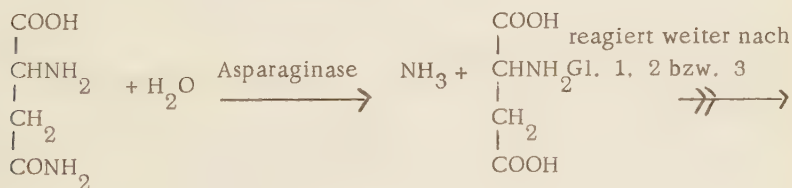
Gleichung 3

Bilanz



Prinzip der Asparagin-Bestimmung: Auf der Basis des eben beschriebenen Systems der Asparaginsäure-Bestimmung wird ein Test entwickelt, der außerdem die Messung des Asparagins gestattet. Durch Zusatz von Asparaginase im Anschluß an die Messung der Asparaginsäure wird aus dem Asparagin ebenfalls die Asparaginsäure frei und kann auf die gleiche Weise bestimmt werden:

Gleichung 4



Reagenzien

Für den Aspartat-Asparagin-Test:

1. Tri-äthanolamin-Puffer, 0,5 m, pH 8, (mit HCl eingestellt).
2. Pyridoxalphosphat (Böhringer) 2,5 mg / ml.
(Versuchsmengen von Pyridoxalphosphat wurden uns freundlicherweise von der Firma Böhringer zur Verfügung gestellt.)
3. α -Ketoglutarinsäure 0,13 m, (neutralisiert mit NaOH).
4. hydriertes Diphospho-pyridin-nucleotid, (DPN-H) 0,015 m.

5. + Milchsäuredehydrogenase, krist., spez. Akt. 13 600, 0,8 mg Protein pro ml. ¹⁾
6. + Äpfelsäuredehydrogenase, spez. Akt. 1600, 17,8 mg Prot. /ml. ¹⁾
7. + Glutamat-Aspartat-Transaminase, spez. Akt. 10900, 39,5 mg Protein/ml. ¹⁾
8. + Asparaginase, spez. Akt. 410, 25 mg Protein / ml. ¹⁾

Für die Vorbehandlung der zu testenden Lösungen:

9. Carboraffin (Merck).
10. Natrium-Fluorid.
11. Perchlorsäure, 30%ige Lösung.
12. KOH, 5%ige Lösung.

Für die Aktivitätsbestimmung der Fermente:

13. Asparaginsäure puriss. (Merck) 0,1%ige Lösung.
14. + Asparagin (Merck), 0,015 m (frei von Asparaginsäure!). ¹⁾
- (15. Aluminiumoxyd (Merck) für Adsorptionsanalyse).
16. Phosphatpuffer nach Sørensen, 0,1 m, pH 7,4 und pH 8.
17. Oxalessigsäure, 0,1%ige Lösung, (mit NaOH neutralisiert).

Für Anreicherung der Fermente:

18. Ammonsulfat p. a. (Merck), und Ammonsulfat umkristallisiert nach Bücher (15).
19. Ca-Phosphat-Gel nach M. Kunitz, J. Gen. Physiol. 35, 340 (1952).
20. Natriumsulfat p. a.
21. K-äthylendiamin-tetraacetat, (Trilon).
22. Rinderalbumin, 1%ige Lösung (zur Verdünnung der Fermente bei Aktivitätsbestimmungen!).

Anmerkungen:

- zu 5: Siehe S. 11 Absatz 2. Anreicherung auch nach Bücher (15).
- zu 6: Ein nach der Vorschrift von Athenstädt (12) dargestelltes Präparat von kristall. Äpfelsäuredehydrogenase wurde mir von Herrn F. Matschinsky freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
- zu 7: Anreicherung nach Green (11), siehe auch S. 9.

1) Siehe Anmerkungen dazu weiter unten.

zu 8: Anreicherung nach Meister (16), siehe auch S. 19 f.

zu 14: Herstellung eines Aspartat-freien Asparagins durch Adsorption der Asparaginsäure an Aluminiumoxyd: angelehnt an S. P. Bessman (17) wurden 50 g Al_2O_3 eine Minute mit 250 ml HCl gerührt und mit aqua dest. nachgewaschen, bis die Waschwasser neutral waren. Eine Säule, Durchmesser 13 mm, wurde bis zu 35 cm mit dem so vorbehandelten Aluminiumoxyd aufgefüllt, und 40 ml 0,1 m Asparaginlösung (Gehalt an Asparaginsäure etwa 2 %) bei 3° C innerhalb von etwa 3,5 Std. durch die Säule geschickt. In der aufgefangenen Lösung fand sich kein Aspartat mehr, die Bestimmung ergab aber nur noch eine 0,014 molare Asparaginlösung. Diese, oder eine Lösung mit einer Konzentration der gleichen Größenordnung, ist für die Bestimmung der Asparaginase sehr geeignet.

Für die optischen Bestimmungen wurde ein Eppendorf-Photometer (Hersteller: Metheler u. Hinz, Hamburg) mit thermokonstant heizbarem Küvettenhalter benutzt. Alle Messungen erfolgten bei 25°, bei der Wellenlänge 366 m μ und bei der Schichtdicke 1 cm. Für den Asparaginsäure-Nachweis auf dem Papier ist außerdem eine UV-Lampe und ein für die Papierchromatographie übliches Gerät zum gleichmäßigen Besprühen des Papierses nötig. Die Fermente und die unbeständigen Substanzen wurden während der Versuche im Eisbad und über Nacht in der Tiefkühltruhe verwahrt.

Eigene Untersuchungen

Das gestellte Thema legt eine Besprechung der Arbeit in folgenden vier Abschnitten nahe:

- I. Ausarbeitung des Asparaginsäure-Testes für Messungen in Harn und Plasma.
- II. Ausarbeitung einer optisch-enzymatischen Methode zur Bestimmung des Asparagins.
- III. Nachweis von Aspartat und Asparagin im Papierchromatogramm durch Fluoreszenz im UV-Licht.
- IV. Anwendung der Methoden auf orientierende Messungen bei Erkrankungen und bei Stoffwechselversuchen.

I. Ausarbeitung des Asparaginsäure-Testes für Messungen in Harn und Plasma

Die ersten Versuche mit einer nach Green (11) angereicherten, aber noch relativ unreinen Glutamat-Aspartat-Transaminase machten sehr deutlich, wie notwendig es ist, ein möglichst gereinigtes Enzympräparat für unsere Versuche zu verwenden. Wir fanden in dem Präparat nicht nur störende Mengen der Glutaminsäuredehydrogenase¹⁾, sondern außerdem sehr hohe Aktivitäten der Milchsäuredehydrogenase und der Äpfelsäuredehydrogenase, wie auch eine dunkelrote Färbung des Präparates, die eine beträchtliche und störende Lichtabsorption mit sich brachte. Unser Bemühen um ein Enzym mit höherer spezifischer Aktivität führte zu einigen Beobachtungen und Änderungen des Verfahrens gegenüber der Methode Green. Deshalb soll der Anreicherungsangang hier angeführt werden.

Der Test der Enzymaktivität erfolgte nach dem Prinzip von Ladue (14) unter Zusatz von Pyridoxalphosphat, dem Co-Enzym der Transaminierungsreaktion, nach den Angaben von O'Kane (13): In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß im Verlauf der Anreicherung der Glutamat-Aspartat-Transaminase, besonders aber bei Dialyse, der Ferment-Co-Ferment-Komplex zerfällt. Um bei dem Test die Menge des Apofermentes zu erfassen und nicht nur den Anteil, dessen Co-Enzym noch nicht abdissoziiert ist, muß man Pyridoxalphosphat zusetzen und damit das alleine unwirksame Apoferment "regenerieren".

Der Reaktionsverlauf entspricht den Gleichungen 1 bis 3. Nur mißt man beim Enzymtest die Reaktionsgeschwindigkeit, nicht den Gesamtverbrauch an DPN-H,

1) Vgl. S. 12, Abs. 5

wie bei Bestimmungen der Asparaginsäure.

Durchführung: 0,02 ml α -Ketoglutarinsäure, 0,04 ml Pyridoxalphosphat, 0,1 bis 0,2 μ -Mol DPN-H, 2,0 ml Phosphatpuffer, pH 7,4 von 25° C und die Probe werden in eine Küvette pipettiert, mit Wasser auf 2,9 ml aufgefüllt, und die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml Aspartat gestartet. Im ersten geradlinigen Kurvenabschnitt ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Fermentmenge proportional. Die Aktivität wird in Enzym-Einheiten ausgedrückt. 1 E = die Enzymmenge, die in 1 Minute eine Extinktionsabnahme von 0,001 bewirkt. Die spezifische Aktivität ist die Zahl der Einheiten pro mg Fermentprotein. Protein-Bestimmungen wurden optisch in der bekannten Weise mit Biuret-Reagenz durchgeführt.

Die Aktivität der Milchsäuredehydrogenase wurde wie bei Bücher (15) bestimmt, die Aktivität der Äpfelsäuredehydrogenase entsprechend der Aktivitätsbestimmung der Transaminase mit DPN-H, Phosphatpuffer und Oxalacetat (0,1 ml). Man muß sich über die Aktivitäten dieser beiden Fermente in dem Transaminase-Präparat informieren, weil sie beide für unsere Untersuchungen von großer Bedeutung sind. Die Äpfelsäuredehydrogenase muß nur deshalb dem oben angegebenen Testansatz zur Bestimmung der Transaminase nicht zugesetzt werden, weil sie bei unseren Versuchen gegenüber der Transaminase immer im Überschuß in den Proben enthalten war. Die Reaktionsgeschwindigkeit des angegebenen Testes ist also spezifisch für die in der Probe enthaltene Transaminasemenge, nicht etwa für die Menge der enthaltenen Äpfelsäuredehydrogenase, wovon man sich aber durch den Versuch mit Oxalacetat als Substrat gelegentlich überzeugen muß. Die Milchsäuredehydrogenase, ebenfalls in sehr hoher Aktivität in den Präparaten enthalten, stört später bei Messungen im Harn durch Verbrauch von DPN-H für die Hydrierung der im Harn vorhandenen Brenztraubensäure. Wir benötigen sie deshalb in reiner Form und trennen in unserem Anreicherungs-gang einen Teil des Fermentes durch Kristallisation ab.

Der Anreicherungs-gang der Transaminase besteht aus Extraktion, einer Ammonsulfat-Fraktionierung, einem Hitzeschritt, Dialyse, einer Gel-Adsorption und einer abschließenden weiteren Ammonsulfat-Fraktionierung. Der Kristallniederschlag der Milchsäure-Dehydrogenase wird aus der letzten Fraktion gewonnen. (Die Aktivitäten der einzelnen Fraktionen finden sich in der Tabelle unten.)

2 kg Schweineherzen werden möglichst schnell nach dem Tode der Tiere entnommen, abgekühlt und von Bindegewebe, den großen Gefäßen und Fett befreit. Zur Extraktion benutzt man Wasser, das 0,005 molar an Kalium-äthylendiamin-tetraacetat ist und im folgenden als "Trilon" bezeichnet werden soll.

Zunächst werden sie im Fleischwolf, dann im Starmix unter Zusatz von 2 l Trilon pro 1,6 kg Herzen zerkleinert. Weitere 4,4 l Trilon werden zugesetzt und bei Zimmertemperatur 1 Stunde gerührt. Die Hauptmenge des Saftes wird durch Gaze gepreßt und filtriert, der Rückstand mit nochmals 1,6 l Trilon nachgewaschen und ebenfalls abgepreßt. Den 5,2 l der vereinigten Filtrate werden langsam 30 g pro 100 ml Ammonsulfat p. a. (Merck) bei Zimmertemperatur zugegeben und abzentrifugiert. Der Niederschlag wird verworfen (oder für die Anreicherung der Glutamat-alanin-transaminase verwandt), das Filtrat mit weiteren 40 g Ammonsulfat pro 100 ml versetzt und das Ganze über Nacht im Kühlraum stehen gelassen. Alle weiteren Operationen erfolgen im Eisbad oder im Kühlraum. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und in 800 ml 10^{-3} m Trilon aufgenommen. Zu dieser Lösung werden 46 g pro 100 ml umkristallisierten Ammonsulfates gegeben und abzentrifugiert, bis das Filtrat klar ist. Der Niederschlag wird in 80 ml 10^{-3} m Trilon aufgenommen. Bei dem folgenden Hitzeschritt wird diese Lösung bei pH 7,9 in einem Wasserbad von 90° unter schnellem Rühren auf 60° gebracht und in einem weiteren Wasserbad 5 Min. bei dieser Temperatur gehalten. Schnelles Abkühlen, Abzentrifugieren und 2-maliges Nachwaschen mit 10^{-3} m Trilon folgen. Die vereinigten Filtrate ergaben 123 ml. Diese Lösung wurde 15 Std. bei 3° gegen 15 l 10^{-3} m Trilon dialysiert. Zu den 150 ml wurden anschließend 150 ml Phosphatgel gegeben, sorgfältig umgerührt und abzentrifugiert. Das Volumen des Filtrates war 255 ml. Der Niederschlag wird verworfen. Zu dieser Lösung wird doppelt aus 10^{-3} m Trilon umkristallisiertes Ammonsulfat langsam zugegeben und nacheinander einzelne Fraktionen abzentrifugiert. Die erste Fraktion bei 55%iger Ammonsulfatsättigung, die zweite bei 65%iger und die dritte bei 80%iger Sättigung. Das letzte Filtrat wird verworfen. Fraktion II war gegenüber der grünlichen Fraktion I und gegenüber der roten Fraktion III am wenigsten gefärbt. In dieser Fraktion, welche die Hauptmenge des Fermentes enthielt, zeigte sich nach Lösung in möglichst wenig 10^{-3} m Trilon deutlich eine dichte Kristallbildung. Die Kristalle wurden abzentrifugiert, und die Kristallisation wurde durch Zugabe geringer Mengen 65%ig gesättigter Ammonsulfatlösung und Kristallwaschlösung (65% ges. Ammonsulfat) fortgesetzt. Im Kristallniederschlag fand sich keine Transaminase-Aktivität. Das Filtrat, 13 ml, wurde einige Monate in der Tiefkühltruhe aufbewahrt. Weil es in dieser Zeit ein Drittel der Aktivität verlor, wurde es einem Gefrier-Trockenverfahren unterzogen. Bei der Gefriertrocknung verloren wir 5% der Aktivität. Das Trockenpulver selbst ist stabil. In diesem Trockenpulver war die Aktivität der Äpfelsäuredehydrogenase doppelt so hoch wie die Aktivität der Transaminase. Dieses Präparat wurde für unsere Teste verwendet.

Nachstehende Tabelle gibt den Anreicherungs-gang genau an:

Probe	Aktivität ml	Gesamt - aktivität	Spezif. Aktivität	Zerfall
Rohextrakt	$10,4 \cdot 10^3$	$55 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^3$	0%
1. Fällung, Filtrat	$8,0 \cdot 10^3$	83%	$2,64 \cdot 10^3$	
2. Fällung, Präcipitat	$45 \cdot 10^3$	76%	$2,64 \cdot 10^3$	33%
Repräcipitat (46%)	$285 \cdot 10^3$	62,5%	$2,9 \cdot 10^3$	
nach Hitzeschr.	$214 \cdot 10^3$	48%	$10,4 \cdot 10^3$	
nach Gelschritt	$100 \cdot 10^3$	47%	$13,7 \cdot 10^3$	
Fraktion I	$195 \cdot 10^3$	0,7%	$4,3 \cdot 10^3$	
Fraktion II	$1550 \cdot 10^3$	28,5%	$23,2 \cdot 10^3$	73%
Fraktion III	$330 \cdot 10^3$	1,6%	$5,5 \cdot 10^3$	
Trocken- pulver		17%	$13,8 \cdot 10^3$	

Anmerkung: Die Rubrik "Zerfall" bedeutet die Menge des Fermentes in Prozenten, deren Ferment-Co-Ferment-Komplex zerfallen war, die deshalb verloren scheint, wenn man nicht dem Testansatz genügend Pyridoxalphosphat zusetzt (siehe S. 8, Abs. 3)

Die bei der Beschreibung des Anreicherungsanges der Transaminase genannte kristalline Fraktion, die als Milchsäuredehydrogenase identifiziert werden konnte (die Identifikation und weitere Reinigung der Milchsäuredehydrogenase verdanke ich Herrn Bernd Lindemann), wurde mehrmals mit 65% ges. Ammonsulfatlösung gewaschen, dann in 25% ges. Ammonsulfatlösung aufgelöst und wieder bei 65% Sättigung gefällt. Das Präparat hatte eine spezifische Aktivität von 13 600 (nach Bücher (15)).

Ausführung des Asparinsäure-Testes: Sind in einem Testansatz alle für unsere Reaktion notwendigen Substanzen vorhanden: α -Ketoglutarinsäure, Asparaginsäure und Glutamat-Aspartat-Transaminase (zusätzlich das im Anreicherungsang teilweise verlorengegangene Co-Enzym: Pyridoxalphosphat), Äpfelsäuredehydrogenase mit dem Co-Ferment DPN-H und ein geeigneter Puf-

fer, dann kann man die Geschwindigkeit der Extinktions-Abnahme bei 366 m μ am Photometer verfolgen. (Vgl. Gleichungen 1 bis 3).

Bei den notwendigen orientierenden Vorversuchen mit Asparaginsäure-Standardlösungen starteten wir die Reaktion nach Pfl eiderer mit der α -Ketoglutar säure. Außer den besonderen Eigenschaften unseres Enzympräparates und seinen Verunreinigungen durch die Äpfelsäuredehydrogenase und die Glutaminsäuredehydrogenase interessierte uns bei diesen Versuchen besonders die Genauigkeit des Testes unterhalb der von Pfl eiderer angegebenen Grenze von 10 gamma.

Die Transaminase-Fraktion II des oben angegebenen Anreicherungsanges er wies sich als hochaktiv und gestattete die Durchführung einer Bestimmung innerhalb von nur etwa 6 Min. (Siehe Abb. 3).

Daß die Reaktion auch ablief ohne Zusatz einer Äpfelsäuredehydrogenase, daß also dieses Enzym in der Transaminase nach Green noch enthalten ist, war uns schon bei dem weniger gereinigten Enzym aufgefallen. Aber auch bei unserer besten Transaminase-Fraktion wurde an der Gesamtreaktion durch Zusatz einer kristallisierten Äpfelsäuredehydrogenase nichts verändert. Ein Vergleich der Kinetik der Reaktion der Oxalessigsäure mit der Reaktion der Asparaginsäure unter gleichen Bedingungen zeigte auch, daß die erstere sehr viel schneller ablief als die Aspartatreaktion. Der weitaus größte Teil der Oxalessigsäure hatte bereits 6 Sekunden nach dem Umrühren abreagiert, und die Reaktion war nach 1 Min. ganz abgelaufen, während die "Aspartat-Reaktion" erst nach 7 Min. zum Stillstand kam. Die Transaminierungsreaktion ist also in unserem Enzymsystem diejenige, die das Bild der Gesamtreaktion bestimmt.

Spuren von Glutaminsäuredehydrogenase in der nach Green angereicherten Transaminase hatte schon Pfl eiderer festgestellt. Sie führen in unserem Testansatz zu einem langsam und konstant verlaufenden Verbrauch von DPN-H für die Hydrierung der α -Ketoglutar säure zu Glutaminsäure. Man kann dies nach Pfl eiderer durch Extrapolation korrigieren (s. Abb. 3). Gegenüber unseren ersten Versuchen war dieser konstante Lauf bei Verwendung des besseren Enzympräparates wesentlich langsamer geworden.

Wie nachstehende Tabelle zeigt, ist diese Reaktion durch eine Veränderung des pH sehr stark zu beeinflussen.

T a b e l l e

pH der Lösung	6	6,5	7	7,4	7,9
Geschwindigkeit der Reaktion	2	1	0,5	0,3	0,15

Da die "Aspartat-Reaktion" selbst durch eine Verschiebung des pH nach dem Alkalischen nur unwesentlich beeinflusst wird, ist eine Verschiebung des pH für unsere Messungen auf 8 gegenüber der Messung bei pH 7,4 im Interesse der Unterdrückung der Nebenreaktion vorteilhaft. Weiter ergab eine Untersuchung der Aspartat-Reaktion in Abhängigkeit von der Menge der zugesetzten α -Ketoglutarinsäure, daß schon bei 10 μ der Ketosäure die Reaktionsgeschwindigkeit maximal ist. Deshalb wurde die Menge der α -Ketoglutarinsäure von etwa 700 μ auf 200 μ reduziert.

Die Verkürzung der Meßdauer auf etwa ein Drittel gegenüber Messungen mit weniger aktiven Enzympräparaten sowie die weitgehende Reduktion der Geschwindigkeit der Nebenreaktion bedeuten einen deutlichen Gewinn an Empfindlichkeit für den Test. Wie die nachstehende Abbildung zeigt, entgeht schon 1 gamma Asparaginsäure im Testansatz der Beobachtung nicht, und man kann bei einem Einsatz von 3 gamma bereits von einer exakten Messung sprechen.

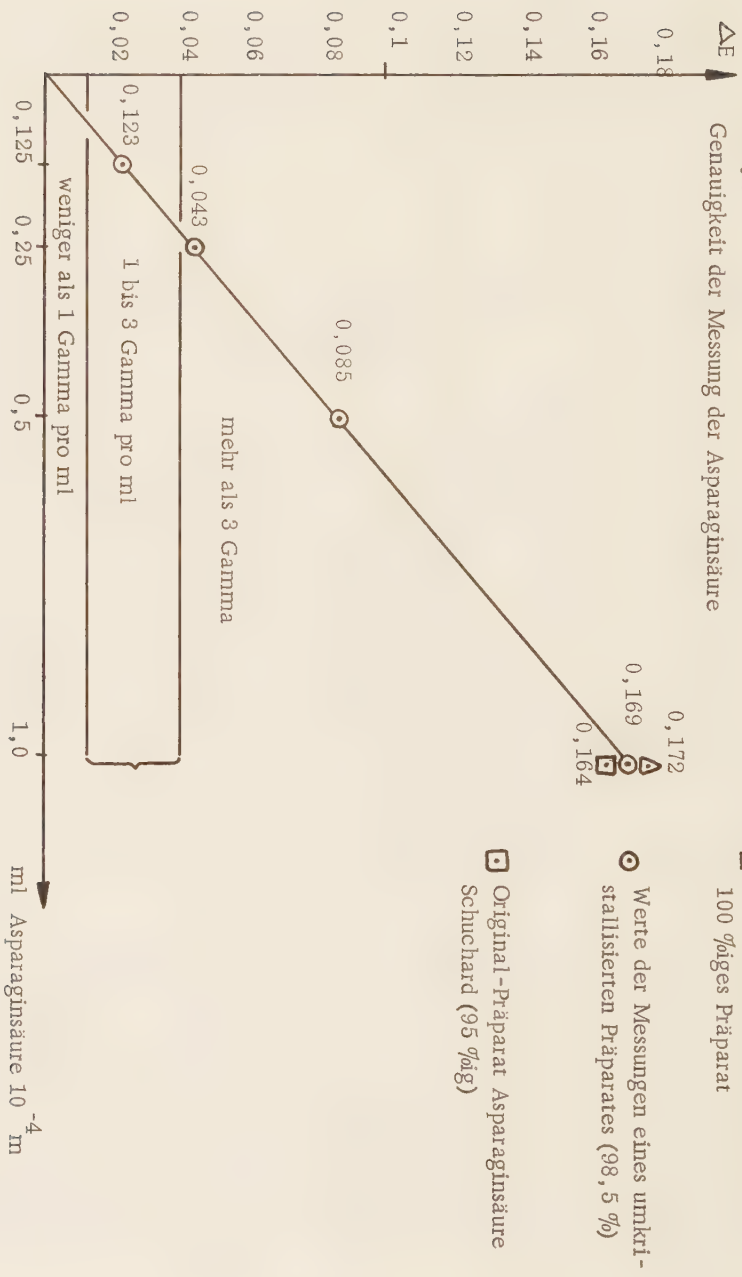
Bei der Übertragung der Methode auf Messungen im Harn ergaben sich eine Reihe von Komplikationen. So beobachteten wir eine Reaktion, die sehr viel schneller ablief und auch stärker war, als wir erwartet hatten. Bei Zusatz von Asparaginsäure zum Harn ergab sich ein Kurvenbild, das deutlich die Überlagerung zweier verschieden schneller Reaktionen zeigte. Wir konnten diesen Effekt durch den bereits oben erwähnten Nachweis der Milchsäuredehydrogenase in unserem nach Green angereicherten Fermentpräparat klären und auf die mit einem DPN-H-Verbrauch einhergehende Hydrierung im Harn vorhandener α -Ketosauren, im wesentlichen wohl der Brenztraubensäure, zurückführen. Da jedoch die Milchsäuredehydrogenase in reiner, von Transaminase freier Form leicht herzustellen ist, kann man diesen DPN-H-Verbrauch durch den Zusatz einer kristallisierten Milchsäuredehydrogenase vor jeder Messung von der Reaktion der Asparaginsäure trennen (siehe Abb. 3). Nach Zusatz der von uns angegebenen Enzymmenge (s. unten!) ist die Reaktion der α -Ketosauren schon nach 1 Min. quantitativ abgelaufen, so daß sie die Messungen kaum verzögert.

Auch die im Harn vorhandene α -Ketoglutarinsäure stört den Test insofern, als die Reaktion nicht mehr durch Zusatz dieser Substanz gestartet werden kann. Als einzige Möglichkeit kommt damit der Start durch das Enzympräparat selbst in Betracht. Damit wird die exakte Bestimmung der für die Berechnung der Asparaginsäuremenge notwendigen Ausgangsextinktion sehr schwierig. Es haben nämlich die Transaminase-Präparate eine mit ihrem Reinheitsgrad schwankende, oft aber beträchtlich Eigenextinktion bei 366 m μ . Die Extinktion des Testansatzes kann so beim Start noch durch die Zugabe der notwendigen Enzymmenge um 0,02 bis 0,09 ansteigen. Da es sich dabei um Mengen von 0,01 ml

Eichkurve der Asparaginsäure-Bestimmung

Abb.1

Genauigkeit der Messung der Asparaginsäure



handelt, ist es kaum möglich, diesen Extinktionszuwachs durch sehr sorgfältiges Pipettieren genau konstant zu halten. Dazu kommt, daß der Harn selbst eine oft beträchtlich hohe aber stark wechselnde Eigenextinktion hat. Man kann also die startende Enzymmenge durch Verdünnung nicht beliebig erhöhen, weil damit wieder ein Verdünnungseffekt ins Gewicht fällt, der um so größer ist, je höher die Eigenextinktion des Harnes liegt. Die Vernachlässigung dieses Verdünnungseffektes kann immerhin zu Fehlern führen, die bis zu 2 μ Aspartat entsprechen. Da die hohe Eigenextinktion außerdem eine erhebliche Verstärkung des Photometers nötig macht (was zu Schwankungen der Ablesungswerte führt), wurde versucht, den Harn durch Vorbehandlung mit Tierkohle zu entfärben. Wie systematische Untersuchungen zeigten, kann man 60 mg Carboraffin (Merck) pro 10 ml Harn zusetzen, ohne daß Aspartat oder Asparagin adsorbiert wird. (Sehr geeignet für die Abmessung ist ein selbstgefertigter Löffel aus Glas.) Erst bei höheren Kohlekonzentrationen wird ein - wenn auch geringer Anteil der Aminosäure an die Kohle adsorbiert. (S. Abb. 2) Die Eigenextinktion des Harns geht bei dieser Behandlung auf etwa 1/5 des Ausgangswertes zurück. Deshalb wurde bei allen unseren Versuchen der Harn auf diese Weise vorbehandelt. Bei Bestimmungen im hydrolysierten Harn darf die Kohle erst nach der Hydrolyse zugesetzt werden.

Die Ausgangsextinktion = $E_{\max}$ läßt sich auf zwei Arten bestimmen. Man kann einmal den Lauf der Reaktion zu Beginn in kurzen Intervallen verfolgen und den Ausgangswert dann durch Extrapolieren gewinnen. Oder man kann nach Beendigung des Testes nochmals die gleiche Menge Transaminase zusetzen und damit den Ausgangswert ermitteln (siehe Abb. 3!). Die reine Berechnung, unter Berücksichtigung aller möglichen Faktoren, wäre komplizierter als zweckmäßig, ist aber manchmal doch notwendig, wenn der Aspartat-Gehalt einer Probe unerwartet hoch war und man den Versuch nicht noch einmal mit geringerem Einsatz an Untersuchungsmaterial wiederholen kann.

Im Interesse der Bestimmung des Ausgangs-Extinktionswertes ist es also wesentlich, ein möglichst konzentriertes Enzympräparat mit geringer Eigenextinktion zu haben, den Harn zu entfärben, die Transaminase sehr genau zu pipettieren, Umschütteln und Stoppen der Uhr sehr genau zu standardisieren und die erste Ablesung möglichst früh (nach 6 Sek.) zu machen, um den Anfangsverlauf der Reaktion in möglichst vielen Ablesungen festhalten zu können. Man wird dann sehr genaue Werte erhalten, nur selten kostbares Enzym kontrollweise zusetzen müssen und notfalls bei der Berechnung zu brauchbaren Werten kommen. Einen Sedimentationseffekt, hervorgerufen durch Trübungen des Küvetteninhaltes, kann man bei sehr genauen Messungen durch Umschütteln nach Beendigung der Bestimmung ermitteln.

Phosphatpuffer erwies sich aus zwei Gründen als nicht geeignet. Das im Harn

Abb. 2
Adsorption in Abhängigkeit
vom Kohlezusatz



vorkommende Ca^{++} kann unter Umständen zu einem Ausfall von Ca-Phosphat führen. Außerdem reicht die Pufferung nicht aus, bei etwas saurerem Harn ein pH von etwa 8 zu garantieren. Aus diesem Grunde verwendeten wir bei unseren Versuchen 0,5 molaren Triäthanolamin-Puffer von pH 8. Der Puffer hemmt keines der beteiligten Fermente und besitzt in dem gewünschten Bereich eine ausreichend hohe Pufferkapazität.

Der nach all den angeführten Gesichtspunkten modifizierte Test von Pfeleiderer erwies sich als brauchbar für Bestimmungen der Asparaginsäure im Harn und im Blutserum. Die Durchführung des Testes soll deshalb abschließend genau geschildert werden.

Durchführung der Bestimmung der Asparaginsäure

Vorbehandlung des Harnes: 24-Stunden-Harn wird unter Zusatz einiger Thymol-Kristalle gesammelt. 10 ml davon werden mit 60 mg Carboraffin versetzt, geschüttelt und filtriert. Zur Bestimmung des "gebundenen Aspartats" wird frischer Harn mit 1/6 Volumina rauchender Salzsäure 5 Stunden im Rückflußkühler gekocht; es ist dann das gebundene Aspartat quantitativ hydrolysiert, und die Probe kann neutralisiert und auf ein definiertes Volumen gebracht werden. Nach Filtration wird dieser Harn wie oben mit Kohle entfärbt. Zur Bestimmung der freien Asparaginsäure werden 1 ml, zur Bestimmung nach Hydrolyse 0,2 ml zur Messung eingesetzt.

Vorbehandlung des Blutes: Man entnimmt das Blut der Cubitalvene, verhindert die Gerinnung durch Verrühren mit 4 mg NaF pro ml Blut und zentrifugiert die Zellelemente. Das NaF stört keines der beteiligten Fermente. Dem Plasma werden 0,1 Vol 30%iger Perchlorsäure zugesetzt, man verrührt gut und zentrifugiert das denaturierte Protein. Das Filtrat wird in graduierten Röhrchen, in einem Eis-Kochsalz-Bad von -3°C , mit KOH neutralisiert und auf ein möglichst geringes, definiertes Volumen aufgefüllt. Das K-Perchlorat fällt dabei aus und wird abzentrifugiert oder filtriert. Die Lösung soll das pH des Testansatzes besitzen.

Test der Proben (siehe auch Abb. 3)

0,9 ml Tri-äthanolamin-Puffer, 0,01 ml α -Ketoglutar säure, 0,04 ml Pyridoxalphosphat, 0,1 bis 0,3 Mol DPN-H (je nach der erwarteten Menge Aspartat), Harn (0,2 oder 1,0 ml) oder Plasma-Extrakt (1 ml) werden in die Küvette pipettiert und mit Wasser auf 1,95 ml ergänzt. Man liest dann die Extinktion ab und gibt 0,01 ml Milchsäuredehydrogenase zu. Die Reaktion der α -Ketosäuren wird bis zum Stillstand abgewartet. (Wenn man annehmen muß oder kann, daß in der Probe auch Oxalessigsäure vorhanden ist, muß in gleicher Weise durch Zusatz einer Transaminase-freien Äpfelsäuredehydrogenase die Oxalessigsäure

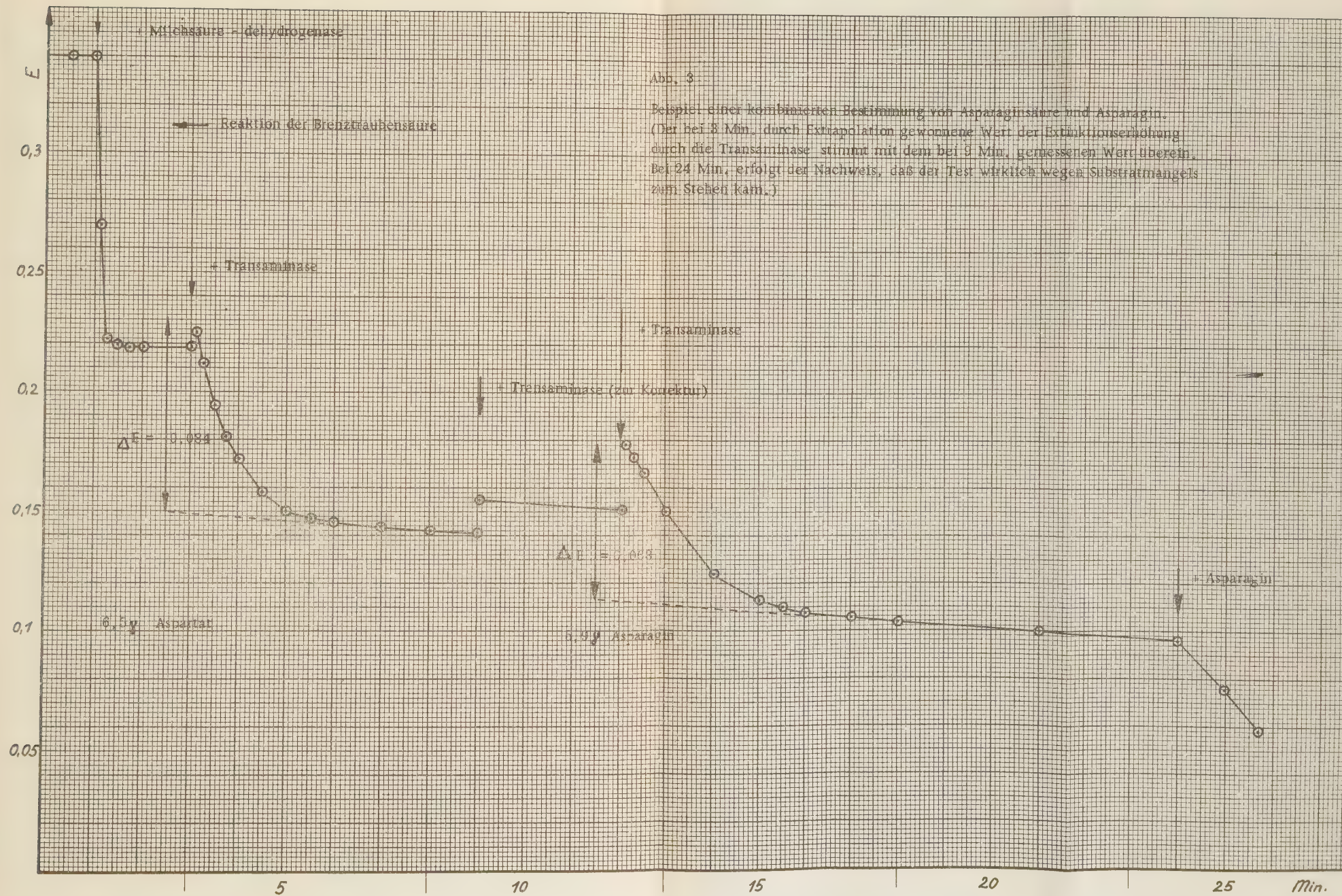
quantitativ hydriert werden, was aber noch erörtert werden wird.) Die Extinktion wird wieder abgelesen. Anschließend werden sehr genau 0,01 ml oder 0,02 ml der Transaminase auf der Innenwand der Küvette aufgesetzt und die Stoppuhr exakt im Augenblick des Umschüttelns in Gang gesetzt (das Gesamtvolumen muß mit diesem Zusatz jedenfalls 2 ml betragen, was bei der Festlegung der Menge des zugesetzten Wassers oder auch des Puffers vorher bedacht werden muß). Man achte darauf, daß sich das Ferment nicht schon vor dem Abstoppen mit dem Testansatz mischt und benutze zum Umschütteln ein Stück gewachsenes Papieres, das jedesmal verworfen wird! Die ersten Ablesungen erfolgen bei 6, 15, 30, 45 und 60 Sek., die weiteren richten sich nach dem Reaktionsverlauf. Nach 5 bis 8 Min. (je nach der Asparaginsäure- und eingesetzten Enzymmenge) wird der Lauf konstant. Die langsame Nachreaktion der α -Ketoglutar-säure (s. S. 12) von etwa 0,001 pro Min. wird genau festgehalten. (Für sehr genaue Messungen wird jetzt durch Umschütteln die auf Sedimentation unlöslicher Substanzen im Testansatz zurückzuführende Extinktionsabnahme bestimmt, bei unklarer Anfangsextinktion durch Zugabe der gleichen Menge Transaminase die Eigenextinktion des Fermentes festgehalten.) Die Werte werden auf Millimeterpapier übertragen und ausgewertet (siehe Abb. 3). Für jede beliebige Konzentration läßt sich der Asparaginsäuregehalt nach folgender Gleichung berechnen:

$$c = \frac{E \cdot 133}{3,44 \cdot 10^6} \text{ g Asparaginsäure/ml.}$$

Darin ist: E: die gemessene, extrapolierte Extinktionsabnahme; 133: das Molekulargewicht der Asparaginsäure; $3,44 \cdot 10^6$: der molare Extinktionskoeffizient von DPN-H für die Schichtdicke 1 cm bei 366 m μ . Ein ΔE von 0,172 entspricht einem Umsatz von 0,1 μ -Mol Asparaginsäure. In Abbildung 3 findet sich die Darstellung einer Bestimmung der Asparaginsäure. (Bezüglich der angeschlossenen Bestimmung des Asparagins s. weiter unten!)

II. Ausarbeitung einer optisch-enzymatischen Methode zur Bestimmung des Asparagins

Wie in dem vorhergehenden Abschnitt erscheint es auch bei dem Versuch, die enzymatische Spaltung des Asparagins in Asparaginsäure und Ammoniak (vgl. Gl. 4!) auch mit unserem Enzymsystem für die Bestimmung des Asparagins zu verwerten, als erstes notwendig, sich mit den Eigenschaften des verwendeten Enzymes auseinanderzusetzen. Dies trifft besonders deshalb zu, weil das Ferment bisher noch nicht rein dargestellt wurde und auch über die Fermentwirkung noch einige Unklarheiten bestehen (Alton Meister (25)). Die Herstellung der Asparaginase erfolgte aus Meerschweinchen-Seren nach Meister (16).



Entwicklung einer optisch-enzymatischen Methode für Asparaginase-Aktivitätsbestimmungen: Bei den bisher veröffentlichten Methoden erfolgen die Aktivitätsbestimmungen der Asparaginase durch Messung des von dem Asparagin nach Inkubation mit Ferment-Proben freigesetzten Ammoniak. Die Nachteile dieses Verfahrens legen nahe, besonders im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen, den gleichen Reaktionsmechanismus, der zur Bestimmung der Asparaginsäure dient, für Aktivitätsbestimmungen der Asparaginase zu benutzen. Denn die Reaktionsgeschwindigkeit müßte dann der eingesetzten Asparaginase menge proportional sein, wenn man anstelle der Asparaginsäure dem Testansatz Asparagin im Überschuß zusetzt. Ausführliche Beschäftigung mit dieser Möglichkeit führte zu einem Enzymtest, den man in der folgenden Weise mit sehr befriedigendem Erfolg durchführen kann.

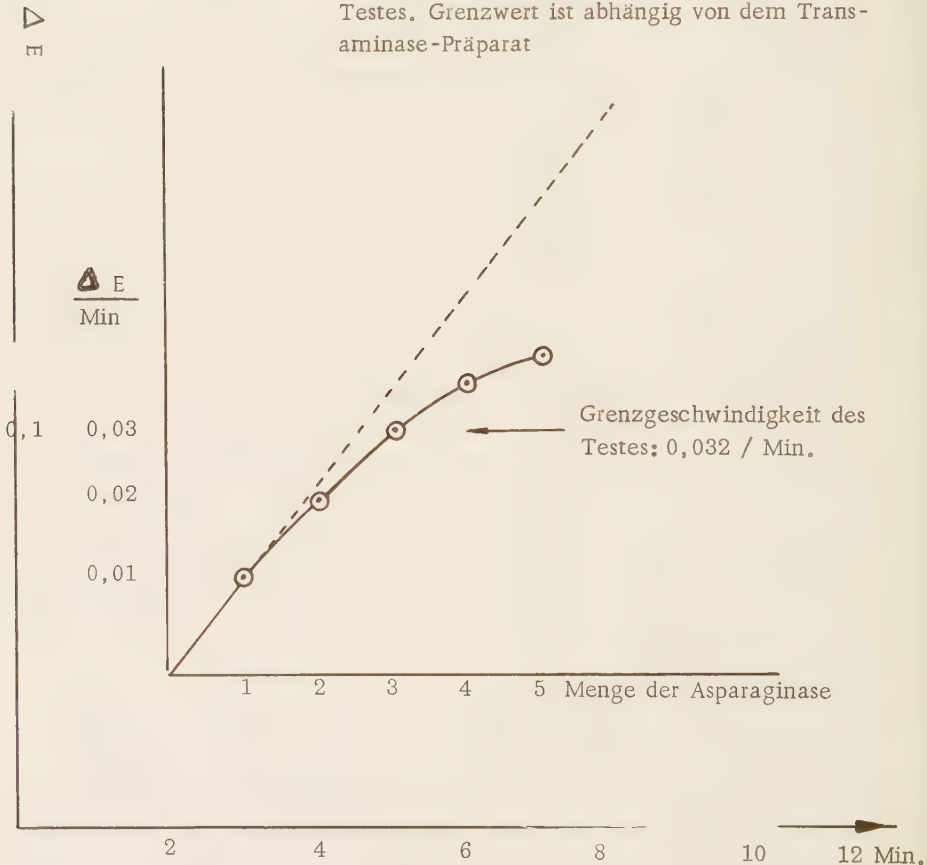
Testansatz und Durchführung: 0,01 ml α -Ketoglutar säure, 0,04 ml Pyridoxalphosphat, 0,01 (bzw. 0,02) ml Transaminase, 0,01 ml Meerschweinchen-Serum (oder eine andere Probe) und 0,1 bis 0,3 μ -Mol DPN-H werden ad 1,95 ml mit Phosphatpuffer von pH 8 aufgefüllt. Die Reaktion wird mit 0,05 ml, 0,014 molar em, aspartatfreiem Asparagin gestartet. (Sind in dem Asparagin noch Spuren von Asparaginsäure enthalten, dann kann man auch die Asparaginase-Probe als Start-Substanz verwenden und die verunreinigende Asparaginsäure vorher abreagieren lassen. Das hat aber neben dem sehr großen DPN-H-Verbrauch noch andere Nachteile, die aber weiter unten erörtert werden sollen.) Die Reaktion erreicht nicht sofort ihren Höhepunkt, sondern läuft innerhalb etwa einer Minute bis zu einem dann konstanten Verlauf an. Abbildung 4 zeigt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit bis zu einer Grenze von etwa $E=0,035$ pro Min. der Fermentmenge proportional ist. Dieser Wert ist abhängig von der Menge der eingesetzten Transaminase und ist für jedes Transaminase-Präparat eigens festzulegen. Man kann dieses Ferment nicht in noch größerer Menge einsetzen, weil es einmal sehr wertvoll ist und weil zum anderen dadurch die Nebenreaktion der Glutaminsäuredehydrogenase zu sehr ins Gewicht fallen würde. Doch ist der Meßbereich bei dem von uns benutzten Präparat bei weitem breit genug, und die Grenze der Meßgenauigkeit wird hier vor allem im Hinblick auf weniger gereinigte Präparate angegeben.

Besonders praktisch für die Anreicherung der Asparaginase ist die "sukzessive" Messung mehrerer Proben nacheinander in einem Testansatz. Man nimmt dabei die Differenz der Reaktionsgeschwindigkeiten als Maß für die Asparaginase-aktivitäten. Wenn man so vorgeht, daß man die vermutlich weniger aktiven Proben zuerst zusetzt, kann man leicht fünf Proben innerhalb von etwa 45 Minuten nacheinander in einem Testansatz untersuchen, bevor die kritische Grenze von $\Delta E = 0,035$ pro Min. erreicht ist. Die geringe Genauigkeitseinbuße, die dabei durch die Verdünnung und die lange Dauer des Testes eintritt, ist für die

Belange eines Anreicherungsanges unbeträchtlich. Diese sukzessive Messung ist dann nicht brauchbar, wenn störende Begleitfermente in den Proben enthalten sind. Ein solches Ferment ist z.B. die Glutaminsäuredehydrogenase in Extrakten aus Meerschweinchen-Lebern. Bei solchen Proben ist darauf zu achten, daß die Konzentration der α -Ketoglutarinsäure keinesfalls höher ist als angegeben (s. auch Diskussion!). Die Asparaginase-Aktivität ergibt sich aus der Differenz der Geschwindigkeiten vor und nach Zugabe des (Aspartat-freien!) Asparagins. Bei den Serum-Proben der Meerschweinchen hat man dagegen keine Schwierigkeiten mit der sukzessiven Methode.

Abb.4

Bestimmung der Meßgenauigkeit des Asparaginase-Testes. Grenzwert ist abhängig von dem Transaminase-Präparat



Als Einheit der Asparaginase bezeichnen wir die Enzymmenge, die unter den angegebenen Bedingungen eine Extinktionsabnahme von 0,001 pro Minute bewirkt. Die Messungen erfolgen bei 366 m μ 25° C und bei 1 cm Schichtdicke.

In der nachfolgenden Tabelle ist ein Anreicherungsang der Asparaginase aus Meerschweinchen-Seren nach Meister (16) wiedergegeben. Fünf Tiere wurden dabei verwendet.

Probe	Vol. (ml)	Akt. /ml	Ges. Akt.	spez. Akt.	% d. Ausg. - menge
Serum	35,7	$3,34 \cdot 10^3$	$119 \cdot 10^3$	83,5	100
1. Filtrat	67	$0,4 \cdot 10^3$	$27 \cdot 10^3$	24	22,5
Nied. schlag	5,5	$16 \cdot 10^3$	$88 \cdot 10^3$	315	74
nach Gel	16,5	$3,5 \cdot 10^3$	$65 \cdot 10^3$	445	55
Trockenplv.	262 mg		$55 \cdot 10^3$	412	46

Ein Trockenpulver wurde durch Gefriertrocknung hergestellt, weil die Lösung außerordentlich wenig stabil ist. (In Lösung geht in 24 Stunden bei 0° C etwa die Hälfte der Aktivität verloren, während die Halbwertszeit beim Trockenpulver im Exsikkator bei 0° C vier Wochen beträgt. Eine von Krebs (7) angegebene Methode, die Asparaginase herzustellen, die offenbar zu wesentlich stabileren Präparaten führt, wurde nicht untersucht.

Versuche zur Bestimmung des Asparagins: Setzten wir dieses Ferment einem entsprechenden Testansatz zu, dann zeigte sich in der Tat die erwartete DPN-H-verbrauchende Reaktion. Sie konnte sowohl durch Asparagin als auch durch das Ferment gestartet werden und war außerdem abhängig von der Transaminase sowie von dem Zusatz der α -Ketoglutar säure. Es besteht also kein Zweifel, daß es sich um die in den Gleichungen 1 bis 4 aufgezeigten Reaktionen handelt. Die Asparagin-Reaktion setzt, wie wir das schon bei dem Asparaginase-Test gesehen hatten, nicht gleich mit maximaler Geschwindigkeit ein. Das macht eine sehr genaue Bestimmung des Abgangsverlaufes der Kurve nötig, um die Ausgangsextinktion extrapolieren zu können. Vorteilhaft ist dies aber deshalb, weil auch für große Asparaginsmengen die Ausgangsextinktion immer aus dem Kurvenverlauf abgelesen werden kann. Man muß also nie, wie in manchen Fällen bei der Aspartat-Bestimmung, nachträglich noch Ferment zusetzen.

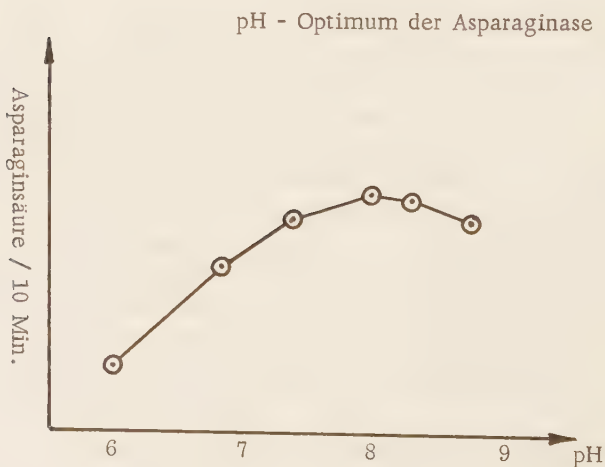
Um diesen Test noch weiter abzusichern, lag uns daran, einige weitere Eigenschaften der Asparaginase zu untersuchen. Vor allem interessierte uns das

pH-Optimum des Fermentes. Diesen Versuch machten wir von den pH-Optima der anderen beteiligten Enzyme unabhängig, indem wir Asparagin bei verschiedenen pH aber unter sonst gleichen Bedingungen mit gleichen Mengen Asparaginase inkubierten und die Fermentreaktion durch Aufkochen abstoppten. Die Abbildung zeigt das optimale pH bei 8. Dieser Wert findet sich auch in der Literatur (Greenstein und Price (18)) und ist für uns sehr günstig, weil wir ja schon aus anderen Überlegungen dieses pH für unseren Test gewählt haben.

Weiter interessierte uns, ob die Asparaginase-Reaktion von einer α -Ketosäure und von Pyridoxalphosphat abhängig ist. Es kann die Desamidierung des Asparagins ja in Form einer einfachen Hydrolyse verlaufen, oder aber in Form einer Transamidierung mit Übertragung der Säureamidgruppe als Aminogruppe auf eine Ketosäure durch Vermittlung des Pyridoxalphosphat. Ein Versuch, der analog dem obigen durch Inkubation gemacht wurde, zeigte, daß jedenfalls die Reaktionsgeschwindigkeit völlig unabhängig von diesen Substanzen war.

Weil dieses Ergebnis nicht unseren Erwartungen entsprach (s. auch Diskussion!), wollten wir es in einer anderen Versuchsanordnung noch einmal absichern. Es besteht ja die Möglichkeit, in unserem Asparaginsäure-Testsystem auch die Menge der α -Ketoglutar Säure zu bestimmen, wenn diese in geringer Menge und die Asparaginsäure im Überschuß vorhanden ist. Wenn die Reaktion, welche durch

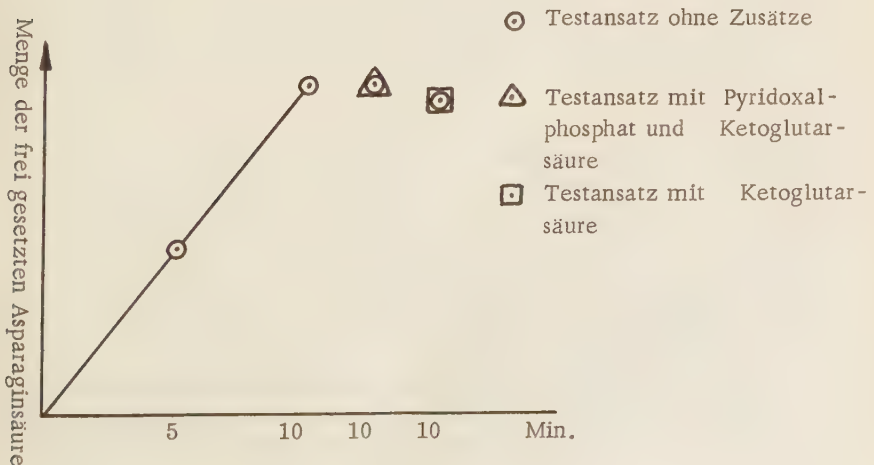
Abb. 5



die Asparaginase katalysiert wird, keine Ketosäure verbraucht, dann müßte man die α -Ketoglutar säure auch mit Asparagin, der Asparaginase und dem Aspartat-Testgemisch quantitativ bestimmen können. Es würde also das Aspartat erst durch die Fermentreaktion aus dem Asparagin geliefert. Wenn aber die Ketosäure für diese Reaktion nicht nötig ist, müßte diese letzten Endes Mol für Mol nach der Gleichung 1 reagieren und das verbrauchte DPN-H der eingesetzten Menge der α -Ketoglutar säure entsprechen.

Unser Versuch ergab für eine definierte Menge α -Ketoglutar säure bei der Messung mit Asparaginsäure ein ΔE von 0,113, bei der Messung mit Asparagin ein ΔE von 0,077. Ein weiterer Versuch ergab für genau die doppelten Mengen α -Ketoglutar säure bei der Messung mit Asparaginsäure ein ΔE von 0,228, bei der Messung mit Asparagin ein ΔE von 0,177. Während die Genauigkeit des Doppelwertes bei der Messung mit Aspartat kaum zu überbieten ist, fehlten bei dem Versuch mit Asparagin das erste Mal 32 %, das zweite Mal 25 %, des erwarteten DPN-H-Verbrauches. Nach diesen Versuchen ist das Ferment in seiner Wirkung nicht auf das Vorhandensein von Ketosäuren angewiesen. Auch die nach Meister (21) erwartete Beschleunigung der Reaktion durch α -Ketoglutar säure bleibt aus. Nach dem letzten Versuch kann man aber die Transaminierung dennoch nicht ganz ausschließen, vielmehr müßte man sie solange in Betracht ziehen, wie der Verlust der α -Ketosäure nicht anders erklärt werden könnte.

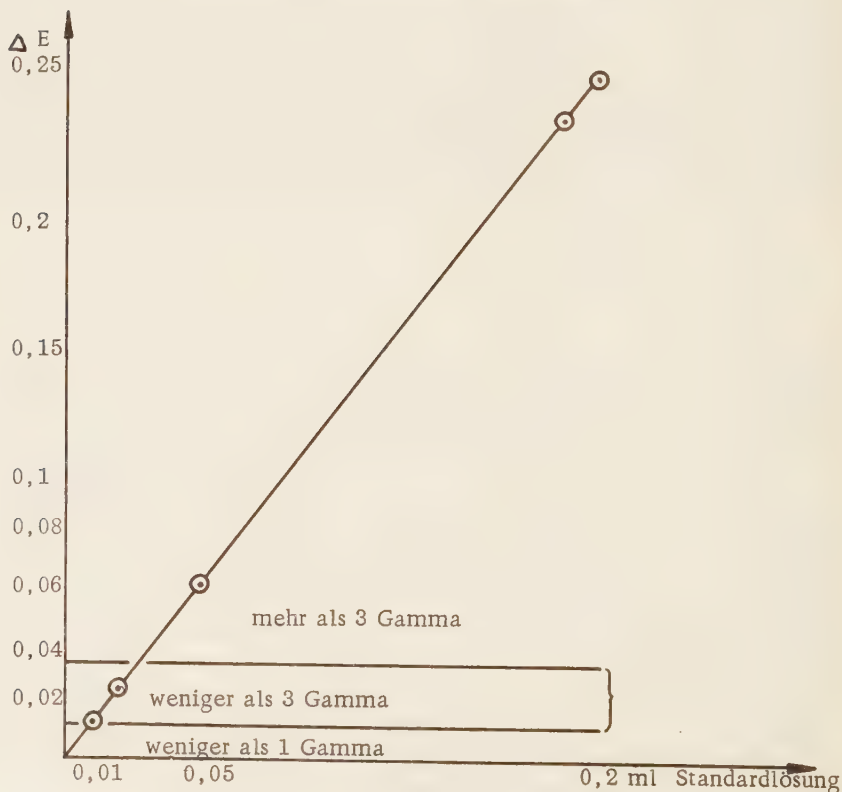
Abb. 6



Die Frage nach der Genauigkeit der Asparagin-Messung kann man aber trotz dieser Unklarheit bejahen. Wir haben dazu folgende Kontrollversuche gemacht: Von einer eingewogenen Menge Asparagin (Merck), die geringe Mengen Asparaginsäure enthielt (ca. 1 %), wurden in unserem Test 98 % als Asparagin wiedergefunden. Eine Eichkurve der Standardlösung zeigte in einem Bereich von 1 bis 20 gamma praktisch keine Abweichungen (siehe Abb. 7!). Von einer dem Blutplasma zugesetzten Menge wurden 101 % wiedergefunden. Der gleiche Versuch im Vollblut zeigte einen Verlust von 12 %, was wohl auf eine Anreicherung des Asparagins in den Blutzellen zurückgeführt werden kann.

Abb. 7

Genauigkeit der Messung des Asparagins



Für den Test des Asparagins ergibt sich aus den Befunden, daß an dem ursprünglich für Asparaginsäure-Bestimmungen gedachten Testansatz weder das pH noch die Menge der eingesetzten α -Ketoglutarinsäure verändert werden muß. Man kann also im gleichen Testansatz die Asparaginsäure und das Asparagin nacheinander bestimmen.

Durchführung der Bestimmung des Asparagins

Nach Abreagieren der freien Asparaginsäure setzt man in der gleichen Weise, wie das vorher mit der Transaminase geschehen ist, 0,02 ml der Asparaginase "nach Gelschritt" oder einer Lösung von 50 mg des Trockenpulvers pro ml dem Testansatz zu. Das Asparagin reagiert dann in etwa 8 Min. ab und wird analog der Asparaginsäure bestimmt (siehe Abb. 3!). (Das Trockenpulver aus dem Serum der 5 Meerschweinchen reicht theoretisch für 250 Asparagin-Bestimmungen. Dies wird aber wegen der geringen Stabilität des Enzymes praktisch nie möglich sein.)

III. Nachweis von Aspartat und Asparagin im Papierchromatogramm mit Hilfe der Fluoreszenz des DPN-H im UV-Licht

Um die Natur der Fraktion des gebundenen Aspartates zu untersuchen, wollten wir uns der Papierchromatographie bedienen. Mit Hilfe eines Prinzips, das von Th. Wieland (19) bei einem elektrophoretischen Trennungsgang zum Nachweis der Milchsäuredehydrogenase verwendet wurde, ist es möglich, unseren Test als qualitativen Nachweis der Asparaginsäure und des Asparagins auf Chromatographie-Papier zu übertragen. Die Methode beruht darauf, daß DPN-H im UV-Licht fluoresziert, während das oxydierte Co-Enzym nicht fluoresziert. Man kann also die Oxydation des Co-Fermentes am Verschwinden der Fluoreszenz erkennen.

Durchführung: Besprüht man Chromatographiepapier sehr gleichmäßig mit dem Enzym-Substrat-Gemisch, das wir bei unseren Messungen in der Kuvette verwenden, und trocknet man anschließend das Papier innerhalb von etwa 2 Min. mit einem Föhn, dann fluoresziert das ganze Papier im UV-Licht, mit Ausnahme der Stellen, an denen vorher Asparaginsäure (oder Asparagin, wenn auch Asparaginase enthalten ist) auf dem Papier war. Die Zusammensetzung des Gemisches ist genau die gleiche, wie bei allen anderen Versuchen; lediglich die Konzentrationen an DPN-H werden bis auf etwa 1/10 der sonst benutzten Menge verringert. Fluoreszierende Substanzen, die sich immer im Harn finden, stören diesen Nachweis nicht, weil es sich um das Verschwinden der Fluoreszenz, nicht um das Auftreten einer solchen handelt. Verringert man die

DPN-H-Konzentration, bis die Fluoreszenz nach Besprühen noch gerade deutlich sichtbar ist, und besprüht man sehr fein und gleichmäßig, dann wird die Empfindlichkeit der Methode sehr viel größer. 0,01 ml einer $1,5 \cdot 10^{-5}$ molarer Lösung (= 0,03 gamma Asparaginsäure) auf einem Fleck waren deutlich nachzuweisen.

Um die Hydrolyse der Aspartat-Konjugate im Papier durchzuführen, stellten wir Versuche mit Glasfaser-Papier (Schleicher und Schüll) an. Die Hydrolyse führten wir in einem Exsikkator, der eine Schale Wasser und eine Schale konz. Salzsäure enthielt, bei 140°C im Trockenschrank durch. Die notwendige Neutralisation des Papiers mit Ammoniakdämpfen nach der Hydrolyse führte aber zu einer so intensiven Salzbildung, daß das Glasfaserpapier seine Saugfähigkeit verlor und der Nachweis der freigesetzten Asparaginsäure mit der Fluoreszenzmethode nicht mehr möglich war. Diese Schwierigkeit mag sich durch eine Veränderung der Methodik noch umgehen lassen. Weitere Versuche in dieser Richtung hätten aber den Rahmen dieser Arbeit überschritten.

IV. Anwendung der Methoden auf orientierende Messungen bei Erkrankungen und bei Stoffwechselversuchen

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Methoden auf Untersuchungen beim Menschen angewandt. Im wesentlichen kam es darauf an, die Methodik auf ihre Eignung weiter kritisch zu prüfen und für solche Versuche orientierende Vorarbeit zu leisten.

Als erstes wurden normale Harn- und Seren auf ihren Gehalt an freier Asparaginsäure und Asparagin, der Harn auch auf den Gehalt an der Gesamtfraktion des gebundenen Aspartates untersucht. Die Ergebnisse dieser Messungen bringen in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Stein und Moore (4), Hier (5)) die in der folgenden Tabelle aufgeführten Werte. Anschließend wurden Harn- und Seren einzelner Patienten zu Bestimmungen verwendet (s. Tabelle !). Als Drittes wurden Belastungsversuche per os durchgeführt mit Asparaginsäure und mit Eiweiß in Form von Quark. Es zeigten sich nach Gaben von 2,5 g Asparaginsäure keine eindeutige Erhöhung der Ausscheidung im Harn, nach Gaben von 5 g Asparaginsäure und 500 g Quark und nach Gaben von 500 g Quark bei einer weiteren Versuchsperson keine meßbaren Erhöhungen des Aspartat- (freie Säure) und des Asparagin-Gehaltes im Blutplasma. Dabei wurden Messungen nach 5, nach 15, nach 30 Minuten und fortlaufend bis nach 5 Stunden durchgeführt.

Tabelle

Person	Harn : mg pro Tag			Serum : mg %	
	geb. Aspartat	Aspartat	Asparagin	Aspartat	Asparagin
I	115	1	23	0,23	0,89
II	161	1	22	0,23	0,76
III	146	1	25	0,2	0,90
IV	136	1	19	-	-
V	126	1	68	-	-
VI	210	1	18	-	-
VII	96	1	14	0,2	0,63
Cirrhose cardiaque	-	1	4,2	0,2	0,58
Cirrhose	-	1	1,3	0,2	0,79
Carcinom	-	1,4	13,5	0,25	0,47
M. Wilson	-	-	-	0,3	1,2

Bei einem Vollblutextrakt wurden 3,4 mg% Asparaginsäure und 1,0 mg% Asparagin gemessen.

Diskussion

Der Schlüssel zu den angegebenen Methoden ist die Anreicherung der Glutamat-Aspartat-Transaminase. Es unterschied sich dabei unser Anreicherungsang von den bei Green und O' Kane (11, 13) angegebenen durch den auffallend geringeren Verlust an Gesamtaktivität bei der ersten Ammonsulfatfällung. Während Green bei diesem Schritt 85 % und O' Kane 79 % (in einem Fall nur 30 %) der Gesamtaktivität verlor, besaßen wir nach diesem Schritt noch 83 % der Ausgangsmenge (s. Tabelle S. 11 !). In unser 12, 2-mal angereicherten Endfraktion waren noch 28 % der Ausgangsmenge enthalten, während O' Kane in seiner nicht ganz so aktiven Endfraktion nur noch 4 % und Green sicherlich keinen höheren Prozentsatz der Ausgangsaktivität bei dieser Fraktion besaß. (Ein exakter Vergleich mit den Ergebnissen ist deshalb nicht möglich, weil Green bei seinen Testen kein Pyridoxalphosphat zusetzte und deshalb den Anteil des Apoferrimentes, dessen Co-Ferriment abdissoziiert war, nicht mit erfaßte (vgl. S. 8)). Bei einem vorhergehenden Anreicherungsang hatten auch wir bei der ersten Fällung ähnlich hohe Verluste. Dabei unterschied sich der spätere, in dieser Arbeit im einzelnen angeführte Anreicherungsang von dem eben erwähnten wie auch von den Anreicherungen bei Green und O' Kane nur dadurch, daß wir dem Extraktionswasser und allen mit dem Ferment in Berührung kommenden Wassermengen Äthylendiamin-tetraacetat (Trilon) zusetzten. Es mag sein, daß die hohen Verluste bei Green, bei O' Kane und bei unserem ersten Anreicherungsang auf Schwermetall-Spuren zurückzuführen sind, und daß wir später diese Verluste durch Zusatz des Schwermetall-Ionen bindenden Reagens verhindern konnten.

Die hohe Aktivität der Äpfelsäuredehydrogenase in unseren Transaminase-Präparaten wird durch den Vergleich mit der von Athenstädt (12) angegebenen Methode zur Kristallisation dieses Fermentes verständlich. Denn auch bei der Anreicherung der Äpfelsäuredehydrogenase bedient man sich anfänglich der gleichen Schritte, die Green zur Anreicherung der Transaminase benutzte. Das Vorhandensein dieser beiden für unsere Reaktionen ohnedies benötigten Fermente in einem Präparat und die Schwierigkeit, sie voneinander zu trennen, legte den Gedanken nahe, überhaupt darauf zu verzichten, ein eigenes Präparat der Äpfelsäuredehydrogenase anzufertigen. Das kann man auch unterlassen, wenn man störende Mengen der Oxallessigsäure in dem Untersuchungsmaterial sicher ausschließen kann. Wir konnten bei keinem unserer Versuche im Harn oder im Plasma Oxallessigsäure messen, und die Unbeständigkeit dieser Substanz mag es rechtfertigen, die Möglichkeit ihres Vorhandenseins im Harn oder im Plasma außer acht zu lassen. Man könnte außerdem die Oxallessigsäure während der Asparaginsäure-Messung selbst daran erkennen, daß sie mit unserem Testgemisch viel schneller rea-

giert als die Asparaginsäure. Man sieht dann an dem Kurvenbild deutlich, wie sich zwei in ihrer Reaktionsgeschwindigkeit verschiedene Reaktionen überlagern und würde dadurch aufmerksam werden (vgl. S.13!).

Daß man die Milchsäuredehydrogenase in kristallisierter Form ebenfalls bei dem Anreicherungsang der Transaminase gewinnen kann, kommt sehr gelegen, weil wir ja ein solches Präparat eben wegen der Verunreinigung benötigen, um die Brenztraubensäure des Untersuchungsmaterials vor unseren Versuchen zu hydrieren. Man kann dieses Ferment aber auch nach Bücher (15) herstellen, oder bei der Firma Böhlinger, Tutzing, kaufen.

Bei der Untersuchung der Asparaginase tauchten einige Fragen auf. Nach Greenstein (18) gibt es eine Asparaginase I, die Hitze-labil, aber von dem Vorhandensein von Ketosäuren unabhängig ist, und eine Asparaginase II, die durch Erhitzen auf 50° C nicht inaktiviert, deren Wirkung aber durch α -Ketosäuren beschleunigt wird. Ersteres ist also eine desamidierende, letzteres eine transamidierende Asparaginase.

Nach A. Meister (21) hat die α -Ketoglutarsäure unter den vielen Ketosäuren, die diese Wirkung besitzen, dabei nur 30 % der Wirkung der in dieser Beziehung optimalen Brenztraubensäure. Immerhin steigert sie die Aktivität einer Asparaginase-II-Fraktion von 8, ohne α -Ketoglutarsäure, auf eine Aktivität von 30. Bei diesen Angaben handelt es sich um Präparate aus Rattenlebern. Die Asparaginase II wurde überhaupt nur in Leberextrakten beschrieben. Unsere Asparaginase aus Meerschweinchen-Seren hatte einen Hitzeschritt von 10 Min. bei 50° C ohne ins Gewicht fallende Verluste vertragen. Der auf S. 22f. beschriebene Versuch zeigt aber, daß dieses Ferment durch α -Ketoglutarsäure nicht aktiviert wird. Die aus Meerschweinchen-Seren gewonnene Asparaginase scheint also weder mit der Asparaginase I, noch mit der Asparaginase II identisch zu sein. Es handelt sich um ein Hitze-stabiles, von α -Ketoglutarsäure unabhängiges Ferment.

Der in dieser Arbeit angegebene Test der Asparaginase ist nur mit einer hochaktiven Glutamat-Aspartat-Transaminase möglich. Gegenüber den bisher verwendeten Methoden hat er den Vorzug, ein optischer Test zu sein, bei dem man in einem Versuch viele Ablesungen machen kann. Auch ist er einfacher in der Handhabung, wenn man einmal über die notwendigen Enzyme verfügt. Für die Bestimmung der von Ketosäuren unabhängigen Asparaginase (I), wie sie in Meerschweinchen-Seren vorkommt, ist der Test in der angegebenen Weise sicher einwandfrei. Ob er für die Bestimmung der Asparaginase II aus Lebern geeignet ist, können wir nicht mit Sicherheit sagen, weil wir nur einige Versuche mit Leberextrakten durchführten. Die Schwierigkeit bei solchen Versuchen liegt darin, daß in der Leber Glutaminsäuredehydrogenase in größerer Menge vorkommt.

Dieses Ferment führt natürlich in unserem Testansatz wegen der α -Ketoglutar-säure zu einem Verbrauch an DPN-H in der uns schon bekannten Weise, aller-dings in wesentlich höherem Ausmaß. Um diese Reaktion nicht bei jedem Test genau mitbestimmen zu müssen, könnte man vielleicht auch versuchen, die α -Ketoglutar-säure durch die α -Keto- γ -methyl-glutar-säure zu ersetzen. Die-se kann nämlich die α -Ketoglutar-säure in der Transaminierungsreaktion, die unseren Untersuchungen zugrunde liegt, ersetzen (siehe A. Meister (2) S. 178 !). Da aber auch die Asparaginase eine Ketosäure benötigt, mußte man außerdem unter den vielen Ketosäuren, die für diese Wirkung in Frage kommen (Meister (21)) eine wählen, die durch keines der beiden Fermente, die un-ser Transaminase-Präparat verunreinigen, hydriert werden kann. Außer der α -Ketoglutar-säure scheiden aus diesem Grunde auch die Brenztraubensäure, die Glyoxylsäure und die α -Ketobuttersäure aus.

Diese Frage, nämlich die Brauchbarkeit des angegebenen Asparaginase-Testes auch für die Bestimmung der Leber-Asparaginase, wäre ebenso wie der fehlge-schlagene Versuch einer Bestimmung der α -Ketoglutar-säure auch mit Aspara-gin und Asparaginase (siehe S.23 !) noch weiter zu klären. Eine solche Unter-suchung würde aber den Bereich dieser Dissertation überschreiten. Sicherlich aber wäre die angegebene Methode der Aktivitätsbestimmung der Asparaginase mit einem optischen Test sehr gut geeignet, einer Reihe von Unklarheiten auf den Grund zu gehen, die mit der Wirkung dieses Fermentes noch verbunden sind. (Alton Meister (25)).

Bestimmung der Asparaginsäure und des Asparagins: Der un-tere Grenzbereich der beschriebenen Methode liegt bei 1 bis 3 gamma Aspara-ginsäure oder Asparagin im ml der zu untersuchenden Lösung. Bis an diese Gren-ze sind genaue Messungen durchführbar. Aus diesem Grunde ist es für die außer-ordentlich geringen Mengen freier Asparaginsäure in den Körperflüssigkeiten nicht möglich, exakte Werte anzugeben. Aber schon geringe Erhöhung der "Nor-malwerte" (von Normalwerten der freien Säure im Harn oder im Serum zu spre-chen scheint nicht gerechtfertigt, weil die Werte, die als Normalwerte in ent-sprechenden Tabellen aufgeführt werden, entweder auf überhaupt fragliche Mes-sungen (Stein und Moore (6, 7)) oder auf einen Einzelfall (Hier (5)) zu-rückzuführen sind.) können mit der Methode sicher erkannt werden. Die Normal-werte von Asparagin und der Gesamt-Fraktion des gebundenen Aspartates sind mit guter Meßgenauigkeit bestimmbar. Aus diesen Gründen ist die Methode für Untersuchungen des Stoffwechsels der Asparaginsäure und des Asparagins im Organismus brauchbar. Sie hat sehr wesentliche Vorteile gegenüber anderen Ver-fahren. Es ist die Empfindlichkeit höher; als optischer Test ist sie in der Durch-führung einfach besonders durch die Möglichkeit, Asparagin und Asparaginsäure nebeneinander in einem Testansatz zu bestimmen. Die Meßdauer für eine kombi-

nierte Bestimmung beträgt etwa 20 Min. (Mit gleichen Lösungen und mit gleicher Methodik wäre auch die dem Stoffwechsel der Asparaginsäure durch Transaminierungsreaktionen benachbarte α -Ketoglutarssäure bestimmbar.) Die notwendigen Vorbehandlungen des Harnes und des Blutes sind unerheblich. Gegenüber dem ebenfalls enzymatischen Bestimmungsverfahren nach Krebs ist das für die Fermente wesentlich günstiger liegende pH unserer Testlösung hervorzuheben. (Krebs mußte ein saures pH wählen, um die entstehende Kohlensäure quantitativ auszutreiben, was die Transaminase- und die Asparaginase-Wirkung und damit auch den Test insgesamt wesentlich verlangsamt.) Eine gewisse Mühe ist notwendig, um geeignete Ferment-Präparate herzustellen.

Der Test besitzt eine große Spezifität. Von den Aminosäuren reagiert außer der Asparaginsäure nur die Cysteinsäure mit dem Enzymsystem. Diese Reaktion verläuft aber wesentlich langsamer und kann deshalb extrapoliert werden (Pfleiderer). Alle Substanzen, die mit Milchsäuredehydrogenase unter Verbrauch von DPN-H reagieren, also in erster Linie die Brenztraubensäure, müssen allerdings durch Zusatz einer Transaminase-freien Milchsäuredehydrogenase vorher umgesetzt werden. Das gleiche gilt in fraglichen Fällen für die Oxalessäure, entsprechend durch Zusatz von Äpfelsäuredehydrogenase. Die Reaktion der α -Ketoglutarssäure mit DPN-H und NH_3 , verursacht durch Spuren von Glutaminsäuredehydrogenase, kann ohne Genauigkeitseinbuße extrapoliert werden (Pfleiderer). Die Zahl der außerdem bekannten, mit DPN-H wirksamen Fermente ist beschränkt (Hoffmann - Ostenhoff (20)) und man kann die Möglichkeit ihrer Störung für jede einzelne der bekannten Reaktionen durch Überlegung ausschließen. Man darf also annehmen, daß es sich wirklich nur um Asparaginsäure handelt, wenn wir unter den angegebenen Bedingungen den charakteristischen Extinktionsabfall beobachten.

Vielleicht könnte die Möglichkeit, eine Substanz über ein DPN-H-Fermentsystem auf dem Papier mit Hilfe der Fluoreszenz im UV-Licht zu identifizieren, für andere Untersuchungen nützlich sein. Wesentlich ist dabei, daß es sich um das Verschwinden der Fluoreszenz, also um die Oxydation von DPN-H, nicht um das Auftreten einer solchen handelt. Für die Entstehung einer Fluoreszenz bestünden sovieler Möglichkeiten, daß sie nicht als spezifisch angesehen werden kann. Die Empfindlichkeit des Nachweises ist außerordentlich hoch und übersteigt die Empfindlichkeit der Färbung mit Ninhydrin.

Die Bestimmung der Normalwerte im Harn brachte eine Bestätigung bereits bekannter Werte. (Vgl. Hier (2)) Während die Werte im Harn nach Hydrolyse bei sieben Personen im Durchschnitt ca. 140 mg pro Tag betrugen (bei Hier war der Durchschnittswert von 18 Personen 164,5 mg pro Tag) lag die Konzentration der freien Asparaginsäure unter der meßbaren Grenze, mit Sicherheit also unter etwa 1 mg pro Tag. Wenn man bedenkt, daß auch Hier, der mit der

mikrobiologischen Methode arbeitete, der empfindlichsten von allen, nur in einem von den 18 Fällen überhaupt freie Asparaginsäure fand (1,3 mg pro Tag) und daß übereinstimmend Stein und Moore und andere Asparaginsäure in freier Form nicht sicher feststellen konnten, kann man sagen, die freie Asparaginsäure kommt unter physiologischen Bedingungen im Harn praktisch nicht vor.

Die Ausscheidung des Asparagins schwankte stark und betrug bei 7 Personen im Durchschnitt 27 mg pro Tag. Das sind etwa 20 % der Fraktion des gebundenen Aspartats (siehe Tabelle S. 27 !).

Im Plasma fanden wir ebenfalls übereinstimmend mit anderen (Stein und Moore (4)) keine freie Asparaginsäure. Das heißt, die Konzentration liegt unter 0,2 mg %. Die Werte des Asparagins im Blutplasma betrugen bei 4 Personen im Durchschnitt 0,80 mg %, gegenüber 0,58 mg % bei 3 Personen in der Literatur (Stein und Moore (4)).

Ein Befund, der vielleicht für die Klinik von Interesse sein könnte, ist die Erniedrigung der Asparaginwerte im Harn der beiden untersuchten Fälle mit Lebercirrhose (siehe Tabelle S. 27 !); er bedarf aber der weiteren statistischen Sicherung.

Bei dem Belastungsversuch wurden neben Eiweiß in Form von Quark 5 g Asparaginsäure eingenommen. Denkt man sich nur diese 5 g Asparaginsäure im Blut verteilt, dann entspräche diese Menge einer Konzentration von etwa 1 mg pro ml. Schon 1 % davon könnten wir exakt und unverkennbar im Serum messen. Da wir innerhalb von 5 Stunden nach der Einnahme weder für die Asparaginsäure noch für das Asparagin eine Erhöhung im Blutplasma feststellen konnten, ist erwiesen, daß die Asparaginsäure nach der Resorption weder als solche, noch als Asparagin in den Kreislauf gelangt. Sie wird auch im Harn nach Belastung nicht vermehrt ausgeschieden. Nach (29) erscheint sie dagegen in größerer Menge im Harn, wenn sie intravenös infundiert wird. Es wird also die Asparaginsäure nicht durch die Niere zurückgehalten, sondern es kommt schon vorher gar nicht zum Übertritt der freien Säure ins Blut. Nicht erst die "Aspartaturie" sondern bereits die "Aspartatämie" ist ein unphysiologischer Zustand, was ja in dem Auftreten von Übelkeit und Erbrechen nach intravenöser Infusion (6) deutlich zum Ausdruck kommt. Im Vollblutextrakt fanden wir wesentlich höhere Werte für die freie Asparaginsäure (3,4 mg %), wie auch nach Stein und Moore (4) die Konzentration der Asparaginsäure in den Zellen und Organen wesentlich größer ist. Aber auch dieser Wert im Vollblutextrakt war nach Belastung nicht meßbar erhöht.

Nach Flaschenträger (23) nimmt man für Aminosäuren allgemein an, daß sie teils im Darm und in der Leber schon zu Peptiden aufgebaut werden und als solche im Plasma vorkommen, teils von der Leber festgehalten und zum ande-

ren Teil an Blutzellen adsorbiert im Blut enthalten sind. Dies trifft wohl auch für die Asparaginsäure zu. Nur kommt zusätzlich die Möglichkeit des Aufbaus zum Asparagin (und vielleicht in geringerem Maße auch die Zerstörung durch die Aspartase der Darmbakterien (N. Ellfolk (22))) in Betracht.

Nach unseren Versuchen ist der Anteil, den die Adsorption an die Blutzellen und der Aufbau zum Asparagin in der akuten Phase der Belastung an der Eliminierung der freien Säure haben, jedenfalls gering. Der Aufbau zu Peptiden oder die Speicherung in der Leber spielen wohl eine größere Rolle. Gegenüber anderen Aminosäuren scheint diese Koppelung bei der Asparaginsäure von ganz besonderer Bedeutung zu sein. Während man alle anderen Aminosäuren auch in freier Form sowohl im Plasma als auch im Harn vorfindet (die Konzentrationen betragen von 0,5 bis etwa 5 mg %; vgl. am besten Wissenschaftliche Tabellen, Geigy AG, Basel 1953) kann man die Asparaginsäure erst nach Hydrolyse in den Körperflüssigkeiten nachweisen. Als freie Säure ist sie praktisch nicht vorhanden.

Zusammenfassung

Es wird eine genaue und rasch ausführbare, optisch-enzymatische Methode zur Bestimmung der l-Asparaginsäure durch Transaminierung zu Oxalessigsäure und Hydrierung derselben mit DPN-H und Äpfelsäuredehydrogenase auf die besonderen Bedingungen der Bestimmung im Harn und im Plasma ausgearbeitet. Mit Hilfe der Asparaginase wird eine Methode zur Bestimmung des Asparagins darauf aufgebaut. Die Methoden werden zu einem sehr empfindlichen Nachweis der Asparaginsäure und des Asparagins auf dem Papier mit Hilfe der Fluoreszenz des DPN-H im UV-Licht verwendet. Normalwerte der Asparaginsäure und des Asparagins im Harn und im Plasma werden bestimmt und mit Werten aus der Literatur verglichen, sowie einige Bestimmungen bei Kranken und Belastungsversuche mit Asparaginsäure per os bei gesunden Erwachsenen unternommen. Eine Modifizierung der Anreicherung der Glutamat-Aspartat-Transaminase wird angegeben und eine optisch-enzymatische Methode zur Bestimmung der Asparaginase aus Meer-schweinchen-Seren entwickelt und diskutiert. Das Verhalten der Asparaginsäure im menschlichen Organismus wird diskutiert und Besonderheiten gegenüber den anderen Aminosäuren hervorgehoben.

Literaturverzeichnis

1. Berger, H. : Schw. Med. Wschr. 86 (no 24, 25).
2. A. H. Meister: Biochemistry of the Amino Acids, New York 1957
3. Pfeleiderer, G., W. Gruber u. Th. Wieland: Biochem. Zs. 326, 446 (55).
4. Moore, S. u. Stein, W. H. : J. Biol. Chem. 176, 337, 367, (48);
178, 53 (49); 192, 663, (51); 211, 893, 907 (54).
5. Woodson, H. W., Hier, St. W., Solomon, J. D., Bergheim, O. :
J. of Biol. Chem. 172, 613 (48).
6. Moore, St. u. Stein, W. H. : J. Biol. Chem. 211, 915 (54).
7. Krebs, H. A. : Biochem. J. 47, 605 (50).
8. Eades, C. H. u. Pollack, R. L. : Science 119, 510 (54).
9. Moore, St. u. Stein, W. H. : J. Biol. Chem. 219, 257 (56).
10. Stein, W. H. : J. Biol. Chem. 201, 45 (53).
11. Green, D. E., Leloir, L. F. u. Nocito, V. : J. Biol. Chem. 161, 559 (47).
12. Athenstädt, R. : Diplomarbeit 1956, Universität München.
13. O'Kane, D. O. u. Gunsalus, I. C. : J. Biol. Chem. 170, 425 (47).
14. Biochemica Boehringer, SGOT-Test, C. F. Boehringer u. Soehne GmbH,
Mannheim.
15. Bücher, Th. u. a. : Zs. f. Naturforschung 8b, 555 (53).
16. Meister, A. : Methods in Enzymology II, S. 383.
17. Bessman, S. P. : Methods in Enzymology III, S. 575.
18. Greenstein, J. P. u. Price, V. E. : J. Biol. Chem. 178, 695 (49).
19. Th. Wieland u. G. Pfeleiderer: Angewandte Chemie, 69, 199 (57).
20. Hoffmann - Ostenhof: Enzymologie, Springer Verlag (54).
21. Meister, A., Sober, H. A., Tice, S. V. u. Fraser, P. E. : J. Biol. Chem. 197,
319 (52).
22. Ellfolk, N: Ann. Academiae Scientiarum Fennicae,
Series A, II. Chemica, 79, Helsinki (46).
23. Flaschenträger: Physiologische Chemie, Springer Verlag (51).

24. Jonxis J.H.P. u. Huisman T.H.J. Metabolism 6, 175 (57).
25. Meister, A.: J. Biol. Chem. 200, 571 (53).
26. Hunnius, C.: Pharmakologisches Wörterbuch. (55)
27. Crouzel Gaz. de Hop. de Toulouse 1898.
28. O. Geßner: Die Gift- u. Arzneipflanzen von Mitteleuropa Heidelberg (53).
29. J. Jonxis, P. Huisman: Metabolism. Vol. VI, No. 2, 175 (57).

Lebenslauf

Am 27. September 1932 wurde ich in Wahlstatt (Schlesien) geboren. 1935 wurde mein Vater, Roman Kapuste, als Studienrat in eine Heimschule nach Habelschwerdt (Schlesien) versetzt. Dort besuchte ich die ersten sechs Klassen der Volksschule. Im Februar 1945 mußte meine Mutter, Anneliese Kapuste, geb. Gollub mit mir und vier weiteren Geschwistern in Abwesenheit meines Vaters nach Süddeutschland fliehen. In Endorf, Obb., besuchte ich die siebte Klasse der Volksschule, bis ich im April 1946 probeweise in das damalige Progymnasium Scheyern aufgenommen wurde. Ich blieb eineinviertel Jahre in Scheyern im Klosterseminar und ging dann nach Marquartstein, wo mein Vater inzwischen eine Anstellung als Heimleiter bekommen hatte. Ich bestand dort die Aufnahmeprüfung in die fünfte Klasse der staatlichen Oberrealschule und blieb in dem Internat der Schule, bis ich 1950, nach Abschluß der siebten Klasse ein Stipendium für einen einjährigen Aufenthalt in den USA erhielt. Ich besuchte ein Jahr lang eine amerikanische Highschool in Maryland und erhielt am Ende des Jahres das Abschlußdiplom dieser Schule. 1951 ging ich zurück nach Marquartstein und bestand 1952 das Abitur an der dortigen Schule. Seit dem Wintersemester 1952 studierte ich an der Universität in München Medizin und habe im Dezember 1958 das Staatsexamen bestanden.

München, den 20.12.1958

